

Búsqueda de bacterias oxidadoras de ácido sulfhídrico para su potencial uso en la producción de
biogás de alta pureza



AURA ALICIA HURTADO HURTADO

JOSÉ IGNACIO SALAMANCA CARRASCAL

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE

INGENIERÍA AMBIENTAL

BOGOTÁ D.C.

OCTUBRE, 2017

**Búsqueda de bacterias oxidadoras de ácido sulfhídrico para su potencial usos en la
producción de biogás de alta pureza**

AURA ALICIA HURTADO HURTADO

JOSÉ IGNACIO SALAMANCA CARRASCAL

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para obtener el título de

INGENIERO AMBIENTAL

DIRECCIÓN:

CAROLINA RUBIANO LABRADOR, PhD.

COORDIRECTOR:

VICTOR FABIAN FORERO

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE

INGENIERÍA AMBIENTAL

BOGOTÁ D.C.

OCTUBRE, 2017

AGRADECIMIENTOS

- Agradecemos a la Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD, la Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente, por la financiación y el continuo acompañamiento en el desarrollo de cada una de las fases de este proyecto, también al Director Víctor Fabián Forero por su guía y dirección, al Semillero de Investigación METAMORFO y el Grupo de Conservación, Bioprospección y Desarrollo Sostenible.
- De igual manera les agradecemos a la docente Carolina Rubiano Labrador por ser nuestra directora de tesis, aportándonos conocimiento, asesoría, tiempo, experiencia, paciencia y apoyo incondicional en el desarrollo de cada una de las etapas de este proyecto de investigación.
- Además, a nuestro padres, familiares y amigos que nos brindaron su apoyo y motivación para no desfallecer y así, lograr el propósito de terminar esta carrera.

RESUMEN

Dentro de las actividades humanas, la generación de residuos es continua y creciente, en Colombia se produce al día unas 31 mil toneladas de residuos sólidos, de los cuales 85 por ciento que podrían aprovecharse, terminan en los rellenos sanitarios, estos vertederos son responsables del 9% al 15% de las emisiones de gas metano (CH_4), el cual tiene un potencial de calentamiento atmosférico 21 veces superior al del CO_2 (Camacho, 2006).

Estos residuos y su manejo, constituyen una oportunidad para los procesos de digestión anaeróbica de la fracción orgánica, especialmente para la producción de biogás, el cual contiene trazas de gas metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2), ácido sulfhídrico (H_2S) y agua (Llaneza et al., 2010). El H_2S es ampliamente conocido como el componente más indeseable del biogás que causó no sólo graves problemas sensoriales y tóxicos, sino también la corrosión de estructuras de hormigón y de acero (Pokorna et al., 2015), ante esta problemática es de vital importancia eliminar las trazas de H_2S , con el fin de obtener biogás de alta pureza.

Teniendo en cuenta que el H_2S representa un problema ambiental, se decidió iniciar a realizar estudios exploratorios con aguas residuales de minería de carbones, metalmecánica y aguas termales, con la finalidad evaluar las diferentes estrategias de medios de cultivos para el aislamiento, identificación y evaluación de microorganismos oxidadores de H_2S .

Las estrategias de cultivo evaluadas permitieron el aislamiento de 17 cepas a partir de las fuentes de aislamiento evaluadas. De acuerdo a la cuantificación de sulfato se determinó que la totalidad de las cepas aisladas en este estudio tienen la capacidad de oxidación de H_2S , destacándose las cepas M14-C2 y M15-C1 con una concentración de sulfato de 18.3 g sulfato/L y 15.4 g sulfato/L, respectivamente. Estas cepas se emplearon para la evaluación de las matrices de inmovilización

(bagazo de caña de azúcar y carbón activado), donde se determinó que la matriz de bagazo de caña de azúcar permite una mayor capacidad de oxidación de azufre de las cepas M14-C2 y M15-C1, obteniéndose una cuantificación promedio de sulfato de 24.035 g sulfato/L.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. MARCO TEÓRICO.....	13
2.1 Generación de residuos sólidos problemática actual.....	13
2.2 Generación de energías alternativas	18
2.3 Eliminación de trazas de H ₂ S para producción de gas de alta pureza	24
2.3.1 Eliminación de H ₂ S mediante procesos fisicoquímicos.....	25
2.3.1.1 Procesos de eliminación no húmedos	25
2.3.1.2 Procesos de eliminación húmedos	27
2.3.2 Uso de microorganismos para la producción de biogás.....	28
2.3.2.1 Características del proceso de oxidación de H ₂ S con microorganismos.....	29
2.3.2.2 Características de los microorganismos oxidadores de H ₂ S.....	30
2.3.2.3 Características fisiológicas de las bacterias sulfoxidantes.....	32
2.4 Antecedentes del uso de microorganismo para la eliminación de H ₂ S.....	35
3. OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo general	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4. METODOLOGÍA.....	38
4.1 Diseño de la investigación.....	38
4.1.1 Población de estudio y muestra.....	38
4.2 Métodos	39
4.2.1 Recolección de muestras.....	39

4.2.2	Estrategias de aislamiento.....	40
4.2.3	Inoculación.....	42
4.2.4	Aislamiento.....	42
4.2.5	Caracterización fenotípica.....	43
4.2.5.1	Morfología.....	43
4.2.6	Evaluación de la capacidad de oxidación de H ₂ S de los microorganismos aislados...	43
4.2.7	Evaluación de diferentes matrices de inmovilización para potencializar la capacidad de oxidación de azufre de las cepas seleccionadas	46
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	48
5.1	Estrategias de aislamiento de microorganismos oxidadores de H ₂ S.....	48
5.2	Aislamiento y caracterización de microorganismos oxidadores de H ₂ S.....	52
5.3	Evaluación de la capacidad de oxidación de H ₂ S de los microorganismos aislados.....	60
5.4	Evaluación de diferentes matrices de inmovilización para potencializar la oxidación de azufre de las cepas seleccionadas.....	65
6.	CONCLUSIONES	73
7.	RECOMENDACIONES	74
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	75
9.	ANEXOS.....	82
9.1	Anexo 1. Curva patrón de sulfatos	82

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Composición de los residuos sólidos municipales en diversos países de América Latina (porcentaje en peso).....	14
Tabla 2. Generación de residuos sólidos y su disposición en la ciudad de Bogotá.....	16
Tabla 3. Características fisiológicas de algunas bacterias sulfoxidantes.....	33
Tabla 4. Descripción de los sitios de muestreo.....	38
Tabla 5. Composición Medio Básico 1.....	40
Tabla 6. Composición Medio Básico 2.....	41
Tabla 7. Distribución de las cepas aisladas de acuerdo al medio de cultivo empleado.....	51
Tabla 8. Caracterización fenotípica de las cepas aisladas.....	53
Tabla 9. Cuantificación de sulfatos de las cepas aisladas.....	62
Tabla 10. Comparación de la cuantificación de sulfato (g sulfato/L) de las cepas M14-C2 y M15-C1 en ausencia y presencia de matriz de inmovilización.....	68

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Ciclo biogeoquímico del azufre.....	30
Ilustración 2. Árbol filogenético de bacterias quimiolitotróficas sulfoxidantes.....	32
Ilustración 3. Recolección de muestras aguas mineras y de manantial termal.....	40
Ilustración 4. Incubación medios de cultivo sólido y líquido.....	42
Ilustración 5. Sub-cultivo de las cepas seleccionadas.....	44

Ilustración 6. Cuantificación de sulfatos de las cepas aisladas.....	46
Ilustración 7. Matrices inmovilizadoras.....	47
Ilustración 8. Cuantificación de sulfatos.....	48
Ilustración 9. Comparación de la cuantificación de sulfato (g sulfato/L) de las cepas M14-C2 y M15-C1 en ausencia y presencia de matriz de inmovilización.....	72

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento poblacional en los últimos tres siglos ha aumentado de manera significativa, trayendo consigo el incremento de consumo de recursos naturales y la generación de residuos sólidos, líquidos y gaseosos que son arrojados al medio ambiente, viéndose afectadas principalmente las grandes ciudades por el asentamiento de un grupo significativo de habitantes. El reglamento técnico del sector de agua potable y saneamiento básico ambiental (RAS) informa que en el 2009 las áreas urbanas de Colombia generan diariamente 25.079 millones de gramos (Mg) de residuos sólidos, de las cuales el 92,8% (23.285,5 Mg/día) tienen una disposición final adecuada en rellenos sanitarios o plantas integrales de tratamiento de residuos sólidos, el 16% restante, correspondiente a 1.796 Mg/día, es dispuesto en botaderos a cielo abierto, en cuerpos de agua, mediante quemas o enterradas en condiciones inadecuadas (Avendaño, 2015). Es así que se estima que en la ciudad de Bogotá para enero del 2015, la generación de residuos orgánicos en el Distrito Capital, que ingresan al relleno sanitario Doña Juana es cerca de 6.134 toneladas diariamente, de las cuales el 68% son residuos orgánicos, es decir 4.171 toneladas de residuos que producen diariamente lixiviados, gases efectos de invernadero, olores ofensivos y la posibilidad de convertirse en cultivo de vectores, lo que genera riesgo a las condiciones ambientales de su área de influencia, así como a la salud de la población aledaña (Alcaldía Mayor de Bogotá, 2015).

Estos residuos y su manejo, constituyen una oportunidad para que por medio de la digestión anaeróbica de la fracción orgánica de los residuos, se produzca una cantidad de biogás que contiene trazas de gas metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2), ácido sulfhídrico (H_2S) y agua, el cual se

puede utilizar para generar energía eléctrica o mecánica. El gas metano se puede utilizar como combustible, aprovechando el valor energético, disminuyendo los gastos económicos y aportando al cuidado del medio ambiente, debido a su alto poder calorífico de aproximadamente 5500 Kcal/m³ y que es clasificando como un gas combustible que puede ser aprovechado térmica o eléctricamente (UPME, 2009).

Sin embargo, para el uso del gas metano es necesario oxidar o eliminar las trazas de H₂S, por tratarse de compuesto toxico para la salud, corrosivo, detectable en el aire por su característica olor a “huevo podrido” aun a muy bajas concentraciones (0.002 mg/L) (Bolívar, 2004), lo cual se puede lograr mediante procesos químicos y/o biológicos. Los métodos químicos pueden resultar altamente contaminantes para el medio ambiente, mientras los biológicos generan una baja contaminación, como es el uso de bacterias oxidadoras de H₂S, siendo una alternativa apropiada para aprovechar este recurso de fácil obtención y al mismo tiempo contribuir al cuidado del medio ambiente (Ramírez, 2007).

Existe un grupo de bacterias llamadas oxidadoras de azufre, que son filogenéticamente muy diversas y están ampliamente distribuidos en diferentes hábitats. En el caso de Colombia, hay diversos ambientes poco explorados desde el punto de vista microbiológico, los cuales representan ecosistemas con propiedades únicas que podrían ser fuentes valiosas de organismos con capacidad de oxidación de H₂S. Bajo este contexto, el objetivo de este estudio fue aislar y seleccionar microorganismos oxidadores de ácido sulfhídrico, para ser empleados en futuros estudios de producción de biogás de alta pureza, para lo cual se emplearon diferentes fuentes de aislamiento que incluyeron un manantial termal ubicado en Tabio (Cundinamarca), aguas residuales

provenientes de industria de metalmecánica, y aguas de explotaciones mineras localizadas en los municipios de Mongui y Paz del Río del departamento de Boyacá. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de oxidación de azufre y el comportamiento en diferentes matrices de inmovilización de las cepas aisladas.

En este trabajo se aislaron 17 cepas a partir de las fuentes de aislamiento evaluadas, las cuales presentaron capacidad de oxidar H_2S , y se determinó que el bagazo de caña de azúcar es la matriz que permite una mayor oxidación de azufre cuando las cepas están inmovilizadas. Este estudio permitió la identificación y selección de microorganismos con potencial capacidad de oxidación de azufre, lo cual abre el camino para futuras investigaciones que permitan el uso de estas cepas para la producción de biogás de alta pureza.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generación de residuos sólidos problemática actual

El aumento en la generación de residuos sólidos asociado al crecimiento poblacional y la globalización que genera la cultura consumista ha llevado a la aplicación de tecnologías apropiadas para la disposición final de residuos sólidos que permitan un control racional de los impactos producidos por los residuos, sin que se ponga en alto riesgo el medio ambiente y la salud pública (Penagos et al.,2011).

Debido a las diversas acciones que se ejecutan en los diferentes sectores económicos del mundo, se ha evidenciado una excesiva contaminación del suelo y agua, especialmente en relación con la generación de desechos orgánicos, quienes se han constituido en un factor de riesgo para los diferentes recursos naturales que se relacionan directamente con estas actividades. La estructura inadecuada para la concentración y manejo de residuos, el crecimiento acelerado de la población y el proceso de industrialización ha aumentado la generación de residuos sólidos, líquidos y gaseosos en las últimas décadas, hace 30 años la cantidad de residuos por persona era de unos 200 a 300 gr/hab/día, mientras hoy se estima entre 500 y 1000 gr/hab/día, y en los países desarrollados esta cifra es dos a cuatro veces mayor (Rodríguez, 2011).

De acuerdo a las investigaciones realizadas por el Banco Mundial, para el año 2025 se espera que la generación de Residuos Sólidos Urbanos (RSU) tienda a duplicarse, pasando la producción per cápita de 1,2 a 1,4 Kg/habitante en los próximos 15 años; es así como la producción actual de 1.300 millones Tn/año será de 2.200 millones para el año 2025. Los principales causantes de este aumento son el acelerado crecimiento poblacional, los hábitos de consumo en países

industrializados y los cambios en las costumbres de los consumidores que habitan los países en vía de desarrollo (Avendaño, 2015).

En la mayoría de los países de América Latina y el Caribe, la cantidad de materia orgánica presente en los residuos sólidos urbanos supera el 50% del total generado, como se muestra en la Tabla 1, de los cuales aproximadamente el 2% recibe tratamiento adecuado para su aprovechamiento; el resto es confinado en vertederos o rellenos sanitarios; otro porcentaje es dispuesto inadecuadamente en botaderos o es destinado a la alimentación de cerdos, sin un debido control y procesamiento sanitario (Bohórquez et al., 2015).

Tabla 1. Composición de los residuos sólidos municipales en diversos países de América Latina (porcentaje en peso).

País	% de materia orgánica
México	63
Costa Rica	58
El Salvador	42
Perú	50
Chile	49
Guatemala	63.3
Colombia	52.3
Uruguay	56
Bolivia	59.5
Ecuador	71.4

Paraguay	56.6
Argentina	53.2
Trinidad y Tobago	27

Fuente: Diagnóstico de la situación del manejo de los Residuos Sólidos Municipales en América Latina y El Caribe. BID, OPS/OMS, 1997.

En Colombia, con base en esta problemática, se ha venido diseñando e implementado nuevas políticas tendientes a la gestión integral de los residuos sólidos, las cuales solo se pueden materializar mediante el seguimiento estricto de la normatividad ambiental (Resolución 1045 de 2003, Decreto 1713 de 2002, entre otras). Es por esto que la implementación de acciones para el aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos es fundamental para el cumplimiento de los objetivos de la gestión integral de los residuos sólidos (Rodríguez, 2011).

Debido a que en Colombia se produce al día unas 31 mil toneladas de residuos sólidos, de los cuales 85% que podrían aprovecharse, pero finalmente terminan en los rellenos sanitarios, en el caso de Bogotá se desechan diariamente 6200 toneladas de residuos entre sólidos y orgánicos, de los cuales 69% son de origen orgánico, que no son aprovechados eficazmente. Estos desechos en su descomposición generan gases nocivos para la salud humana y perjudicial para el medio ambiente (Rodríguez, 2011). En la Tabla 2 se presentan los porcentajes de residuos sólidos y orgánicos producidos actualmente y su disposición final (Esteve, 2012).

Tabla 2. Generación de residuos sólidos y su disposición en la ciudad de Bogotá

Descripción		Residuos generados
Composición de los residuos sólidos	➤ Orgánicos	65%
	➤ Plásticos	14%
	➤ Papel y cartón	5%
	➤ Vidrio	4%
	➤ Caucho	1%
	➤ Metales	1%
	➤ Textiles	3%
	➤ Otros	5%
	➤ Patógenos y peligrosos	2%
Disposición final	1100 toneladas de 1086 municipios distribuidos así.	
	➤ Botaderos a cielo abierto	565 (51%)
	➤ Relleno sanitario (50% semejante a enterramiento)	350 (32%)
	➤ Cuerpos de agua	32 (3%)
	➤ Enterramiento e incineración	163 (15%)
Residuos sólidos hospitalarios	➤ generados en el país	30 ton
	➤ generados en Bogotá	14 ton (46%)

Fuente: <https://reciclajeverde.wordpress.com/>

De acuerdo a los datos que nos brinda la Tabla 2, se evidencia que el mayor porcentaje de residuos sólidos producidos generados son orgánicos, los cuales en su mayoría son arrojados a cuerpos de agua, botaderos a cielo abierto o dispuestos en el relleno sanitario, sin ser aprovechado el potencial que tiene estos residuos para ser incluidos dentro de procesos como: alimentación para animales, compost, lombricultivo, biocombustibles, biofertilizantes, biofermentos, entre otros (Jaramillo et al.,2008).

En Colombia se tiene evidenciado que los estudios de Evaluación de Impacto Ambiental (E.I.A) son meramente descriptivos lo que conlleva a que los planes de manejo ambiental diseñados sean deficientes y además no se aplican de forma adecuada debido a la poca eficacia en el seguimiento a la implementación de los mismos por parte de las autoridades ambientales, ya que no establecen mecanismos de control como indicadores de impacto y gestión que permitan la regulación. Esta realidad no es ajena al emplazamiento y operación de los rellenos sanitarios, cuyos impactos ambientales sobre el agua y el aire se agravan por el importante contenido de orgánicos, que bajo las condiciones de pluviosidad propias de latitudes intertropicales, incrementa la producción de gases, lixiviados y olores ofensivos, situación inductora de conflictividad ambiental en localidades y regiones del país. Es claro que, desde el propósito de reducir el impacto ambiental inducido por los rellenos sanitarios, el aprovechamiento de orgánicos también configura una prioridad en materia de gestión ambiental en el país y en la región (Pinilla, 2015).

De igual forma el aprovechamiento de la materia orgánica en estos procesos contribuye a la minimización de las basuras, conservar y reducir la demanda de recursos naturales, disminuir el

consumo de energía, preservar los sitios de disposición final y reducir sus costos, así como a reducir la contaminación ambiental al disminuir la cantidad de residuos que van a los sitios de disposición final (Jaramillo et al., 2008).

Teniendo en cuenta que una de las dificultades por las que atraviesa la población en general, es el alto costo y consumo de la energía no renovables como fuentes fósiles. Como alternativa ante esta problemática se plantea el empleo y aprovechamiento de la materia orgánica en la generación de en energía renovable como opciones viables, sostenible y que representa una gran alternativa por su bajo costo.

2.2 Generación de energías alternativas

Las Fuentes no Convencionales de Energía Renovable (FNCER) se pueden definir como los recursos disponibles a nivel mundial que son ambientalmente sostenibles para producir algún tipo de energía, pero que no son empleados de manera marginal y tienen baja comercializan, haciendo parte de ellas la biomasa, los pequeños aprovechamientos hidroeléctricos, la eólica, la geotérmica, la solar y los mares (Ley 1715, 2014).

Se puede evidenciar que aproximadamente el 81% de la energía consumida a nivel mundial proviene de fuentes fósiles, mientras que el 19% restante proviene de fuentes renovables, entre las que se encuentran la energía proveniente de fuentes como el sol, la geotermia y la biomasa para su conversión en energía térmica a través del uso de tecnologías relativamente modernas, seguidas de estas y otras fuentes como la eólica para la generación de energía eléctrica. Finalmente, se suman al aprovechamiento de fuentes renovables el uso de biocombustibles en el sector transporte

y tecnologías en etapas incipientes de desarrollo como es el caso de la energía de los mares en forma de mareas, oleaje, gradientes térmicos o gradientes salínicos (REN21, 2014).

Teniendo en cuenta que el sol es una fuente de energía para todos los seres vivos, que su radiación solar es de 175.000 TW (1 TW = 1 millón de millones de vatios). De esto, el 49% es absorbido y re-radiado o reflejado de nuevo en el espacio por la atmósfera, el 4% es retrodispersado desde el suelo y el 47% es absorbido por la superficie de la tierra, La energía comercial total utilizada para todas las actividades humanas en el mundo es inferior a 15 TW. Observando que realmente un porcentaje utilizado para transformar esa energía es muy bajo (Peter et al., 2005).

Sin embargo, de acuerdo a varias investigaciones, tenemos varias maneras de transformar esta energía, en formas que son más adecuadas para el uso diario, entre las que se encuentran la energía mecánica del vientos, el agua y las olas que pueden ser empleadas en la producción de electricidad, los recursos de biomasa, que son producto de procesos biológicos inducidos por la luz solar, para la producción de electricidad o para generar combustibles y la luz solar que se utiliza directamente para producir calor a través del movimiento de electrones en células de silicio (Jiménez et al., 2006).

Se puede evidenciar que el consumo de energía renovable a nivel mundial ha tenido un aumento, siendo así que a principios del siglo XIX el 95% de la energía primaria que se consumía en el mundo provenía de fuentes renovables. Un siglo después tal porcentaje era del 38% y a principios del presente siglo era solo del 16% (Fouquet, 2009). Sin embargo, la tendencia está cambiando, ya que en muchos países industrializados la proporción de energía renovable ha crecido de manera

considerable en las últimas dos décadas. La inversión total en el mundo en energías renovables, que en el año 2004 fue de 22.00 millones de dólares USA, ha crecido de manera espectacular, pasando a 130 en el 2008, 160 en el 2009 y 211 en el 2010. Aproximadamente la mitad de 194 GW estima de nueva capacidad eléctrica añadidos en el 2010 corresponde a energía renovable. A principios del 2011 al menos 118 países tenían política de apoyo a las energías renovables o algún tipo de objetivo o cuota a nivel nacional, muy por encima de los 55 países que lo tenían en 2005 (REN21,2011).

De acuerdo a los estudios del UPME, Colombia es un país que goza de una matriz energética relativamente rica tanto en combustibles fósiles como en recursos renovables. Actualmente, la explotación y producción energética del país está constituida en un 93% de recursos primarios de origen fósil, aproximadamente un 4% de hidroenergía y un 3% de biomasa y residuos (UPME, 2014).

De las anteriores fuentes de energía utilizadas en el país, los combustibles fósiles se han convertido en una de las fuentes más representativas, ya que tiene muchos beneficios energéticos que han permitido su uso a gran escala, pero de igual forma han traído consecuencias desfavorables para el medio ambiente y la salud humana, debido a que el incremento de su utilización ha generado una serie de impactos negativos por el aumento de compuestos tóxicos en la atmósfera, entre los que se destaca el CO₂, CH₄, N₂O, entre otros, con múltiples efectos negativos (UNED, 2016).

Por otro lado, las fuentes energía renovable como la hidroenergía ha sido una gran opción para cubrir las necesidades eléctricas de la población en varios sectores colombianos, pero ha causado

varios impactos al medio ambiente a través de la construcción y operación de estas plantas, entre ellos se encuentra la afectación al medio biótico, abiótico, medio socioeconómico, modificación del paisaje, entre otras (Viviescas, 2014). Sin embargo, la alta dependencia de Colombia de sus recursos hidroeléctricos pone al país en riesgo periódico de escasez y altos precios de la energía, como fue evidenciado en la crisis energética generada por el fenómeno de El Niño en los años 1992 y 1993 o más recientemente en los altos precios de energía experimentados en 2009, 2010, 2013 y 2014. Más aún, análisis recientes han pronosticado que la vulnerabilidad a las sequías crecerá significativamente en Colombia debido al cambio climático (CorpoEma, 2010).

Por otro lado, la biomasa representa una gran alternativa como fuente de energía renovable y contribuye a reducir la contaminación ambiental, es así como la FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura destaca que América Latina produce el 40% de los biocombustibles en el mundo, siendo una fuente de energía renovable de fácil implementación, sobre todo en sectores rurales (FAO, 2012).

Aunque la biomasa como fuente de energía es utilizada en menor proporción, a largo plazo en Colombia se puede considerar la estructuración de una economía que se transforme de la actual dependencia del petróleo (no solo en el aspecto energético sino igualmente en el consumo de derivados de este recurso como materias primas), hacia una economía que pueda migrar tal dependencia a otros recursos energéticos de origen renovable, entre los que la biomasa sería el sustituto directo del petróleo. Para considerar cómo ir avanzando en esa dirección se pueden mirar los ejemplos de los planes esbozados por la Comunidad Europea para los próximos 10 años en materia de inversiones en bioenergía (IEA, 2014), y los primeros pasos que están tomando países

como Estados Unidos y Brasil en el desarrollo de biorefinerías, partiendo de la base de las plantas de biocombustibles que hoy en día existentes en esos países (US DOE, 2013).

Para entender el termino de biomasa es muy importante conocer que existen clasificaciones, la biomasa primaria es aquella que se obtiene directamente de un ecosistema natural para su utilización energética, la biomasa secundaria, también llamada residual, es la obtenida como residuo o subproducto de una actividad humana y un tercer tipo de biomasa se podría llamar a la consistente en un producto procesado previamente a su utilización energética final, como sería el caso del biogás obtenido de la digestión de la biomasa residual húmeda, del biodiesel o del bioetanol. Todos ellos son biocombustibles finales obtenidos en plantas que trasforman la biomasa de origen primario, o secundario en un producto final que podría llegar a denominarse como biomasa terciaria según el criterio establecido, si bien es un término apenas utilizado en la actualidad (Nogues et al., 2010).

Como alternativa para la implementación de energía renovable varios países han venido desarrollados proyectos productivos energéticos empleando la biomasa, buscando no solo producir un tipo de energía, sino brindando una solución a los residuos orgánicos que diariamente son desechados al medio ambiente, los cuales causan una serie de impactos que afecta las cuencas hídricas, el suelo y la atmósfera por la generación de emisiones de gas metano, que conducen a un efecto invernadero, siendo una consecuencia del cambio climático (López et al., 2015).

Dentro de los procesos empleados como alternativa de producción de energía y que al mismo tiempo contribuye al cuidado del medio ambiente, está la digestión anaerobia que involucra la

degradación y estabilización de materia orgánica bajo condiciones anaeróbicas por medio de microorganismos, dando paso a la formación de biogás (metano y dióxido de carbono) como una fuente de energía renovable y biomasa (López et al., 2015).

Se destaca que el biogás está constituido por metano (CH_4) en una proporción que oscila entre un 50% a un 70% y dióxido de carbono, de igual forma contiene en pequeñas proporciones otros gases como hidrógeno, nitrógeno y sulfuro de hidrógeno. El metano contiene un alto poder calorífico, pero para ser llevarlo a otras necesidades de la producción es necesario que se elimine el sulfuro de hidrogeno (H_2S) que viene asociado al mismo, ya que este gas no solo es muy corrosivo, sino además toxico para la salud humana (Díaz, 2010).

El biogás se genera a partir de materiales orgánicos bajo condiciones anaeróbicas, las materias primas para la generación de biogás incluyen estiércol de vaca, excrementos de aves de corral, estiércol de cerdo, residuos de cocina, desechos de hierba y algas. Aquellos países en los que el sector agrícola es un componente del crecimiento de la economía, han encontrado el biogás como reemplazo de la leña, mediante la utilización de estiércol como combustible para cocinar y como calefacción. Debido al aumento de los precios del recurso minerales, los altos riesgos del uso insostenible de la leña y su impacto en el medio ambiente, es crucial para que el gobierno considere otras alternativas que son sostenibles y asequibles. La tecnología del biogás, aunque sea una tecnología bien conocida es relativamente nuevas en algunas partes del mundo y pueden utilizarse como una potente herramienta para abordar los problemas de contaminación, deforestación y el cambio climático. El biogás es un combustible limpio porque no deja hollín o material particulado y también porque es más ligero en términos de longitud de cadena de carbono, menos cantidad de

dióxido de carbono se libera en la atmósfera durante la combustión, esta tecnología ha ayudado a algunos países a generar ingresos, a mejorar el estilo de vida y ahorrar costos (Arthur et al., 2011).

2.3 Eliminación de trazas de H₂S para producción de gas de alta pureza

La concentración de H₂S no disociada disuelto en un líquido, de acuerdo con el pH, presión, temperatura y concentración total de azufre sulfurado, esta concentración de H₂S en el biogás puede alcanzar valores muy significativos que varían de 500 ppmv a 20.000 ppmv (2%). En estas concentraciones provoca no sólo graves problemas sensoriales y tóxicos, sino que también corroe el concreto (Okabe et al., 2007) y estructuras de acero en plantas de biogás (Zhang et al., 2008), daña tuberías y bombas (Burgess et al., 2001) y acorta significativamente la vida útil de los motores de gas de las unidades de cogeneración, donde degrada el aceite lubricante (Gayh et al., 2010). La combustión de biogás con mayores concentraciones de sulfuro de hidrógeno provoca también problemas con emisiones excesivas de SO_x. Además del efecto inhibitor directamente en el proceso de fermentación, estas son las principales razones por las que es necesario eliminar el H₂S del biogás antes de su uso para la producción de energía (Pokorna et al., 2015).

Antes estas dificultades se han empleados diferentes métodos fisicoquímicos y biológicos, los cuales presentan las siguientes ventajas y desventajas:

2.3.1 Eliminación de H₂S mediante procesos fisicoquímicos:

Este método es utilizado sobre todo en las industrias, debido a que permite combatir la corrosión de forma más rápida y en grandes cantidades, pero al mismo tiempo tiene desventajas en los altos costos económicos, requieren mayores requerimientos en procesos de disposición final y causa gran contaminación al medio ambiente.

2.3.1.1 Procesos de eliminación no húmedos

- **Proceso Claus (oxidación directa):** Se basa en la oxidación catalítica del H₂S a azufre elemental. Se trata de uno de los procesos más populares empleados a escala industrial para la eliminación de H₂S con recuperación de azufre elemental. En una primera etapa el H₂S es parcialmente oxidado a SO₂ con aire, y en una segunda etapa, la mezcla H₂S/SO₂ es oxidada a azufre elemental y agua, empleando bauxita como catalizador. La eficacia de conversión de H₂S a azufre elemental es del 90-95% (Kohl et al., 1997).
- **Óxidos de hierro y zinc:** Se basan en la reacción del óxido de un metal con el H₂S para formar el sulfuro del correspondiente metal. Los óxidos son típicamente no renovables, aunque algunos se pueden regenerar parcialmente, pero siempre irán perdiendo actividad en cada ciclo de generación hasta que sea indispensable su sustitución. Para la regeneración se realiza una oxidación para producir azufre elemental y el óxido del metal regenerado. Los metales más empleados para este tipo de proceso son hierro y zinc (Ramírez, 2007).

Se pueden dividir en dos grupos: oxidación a azufre y oxidación a óxidos de azufre. Para el tratamiento de biogás se puede producir mediante esta técnica SO₂, por lo que no se recomienda este tipo de proceso.

Los procesos que emplean óxido férrico son conocidos como “iron sponge”. Según la ecuación de la reacción química, 1 kg de Fe_2O_3 puede eliminar estequiométricamente 0,64 kg de H_2S .



El proceso de regeneración es muy exotérmico y se forma azufre elemental según:



Si se utilizan óxidos de zinc se obtiene al reaccionar con el H_2S sulfuro de zinc según la siguiente reacción general: $\text{ZnO} + \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{ZnS} + \text{H}_2\text{O}$

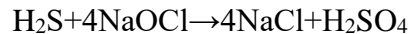
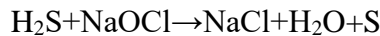
Se emplean temperaturas sobre 200°C a 400°C , siendo la formación de sulfuro de zinc irreversible. Normalmente se emplean formas cilíndricas extruidas del metal de 3-4 mm de diámetro y 8-10 mm de longitud en un lecho fijo (Kohl et al., 1997).

- **Sólidos alcalinos:** También se pueden emplear sustancias sólidas alcalinas como hidróxido de sodio o cal apagada, normalmente se emplean disueltas en agua para utilizarlas en *scrubbers*, pero también se pueden utilizar de forma sólida granular (Ramírez, 2007).
- **Adsorbentes:** Tanto las zeolitas naturales como las sintéticas poseen un tamaño de poro extremadamente uniforme, siendo empleadas para la deshidratación o purificación de efluentes gaseosos. Las sustancias polares como agua, ácido sulfhídrico, dióxido de azufre, amoníaco, sulfuro de carbono y mercaptanos son adsorbidos muy fuertemente, pudiendo ser eliminados de sustancias no polares, como por ejemplo el metano. El carbón activo granulado (CAG) es fundamentalmente empleado para la eliminación de COV's. La

utilización para la eliminación de H₂S ha sido limitada para la eliminación de pequeñas cantidades de H₂S, fundamentalmente en sistemas de desodorización. Para aumentar la eficacia el CAG se ha impregnado con sustancias alcalinas u óxidos (Kohl et al., 1997).

2.3.1.2 Procesos de eliminación húmedos

- **Oxidación en fase líquida:** Oxidación con hipoclorito, es considerado uno de los oxidantes más eficientes para la eliminación de compuestos sulfurados volátiles (Van et al., 1992). En función del pH de la disolución el compuesto activo es OCl⁻ a pH<6, HOCl a 2<pH<6 o Cl₂ a pH<2. La eliminación de H₂S se produce a pH entre 9 y 10 según:



- En este proceso es necesario añadir una base para el control del pH, a pH 9 la absorción de CO₂ es pequeña y no ocurre precipitación de CaCO₃ o MgCO₃. La utilización de hipoclorito permite eliminar además de H₂S compuestos orgánicos sulfurados; en el caso de eliminación de compuestos orgánicos sulfurados tiene un mayor poder oxidante el HClO, comparado con el OCl⁻, siendo por tanto necesario trabajar a un pH más bajo (Hentz et al., 1990; Muirhead et al., 1993).
- **Procesos con alcanolaminas:** Este tipo de proceso permite tratar selectivamente la eliminación de H₂S o la eliminación conjunta de H₂S y CO₂ con altas eficacias de eliminación. El tratamiento con alcanolaminas es el método más comúnmente empleado para eliminar el ácido sulfhídrico de efluentes gaseosos, sobre todo en gases de refinería, y como método para purificar el gas natural (Jensen & Webb, 1995; Kohl et al., 1997). Las

alcanolaminas poseen un grupo hidroxilo en un extremo y un grupo amino en el otro. El grupo hidroxilo disminuye la presión de vapor e incrementa la solubilidad en agua, mientras que el grupo amino proporciona la alcalinidad requerida para la absorción de los gases ácidos. La adsorción se dirige típicamente a altas presiones con recuperación de calor. También se emplean soluciones de glicol, para mejorar la absorción física de los gases ácidos. Algunos ejemplos de alcanolaminas empleadas en los lavadores son las siguientes: monoetanolamina (MEA), dietanolamina (DEA), diglicolamina (DGA), diisopropanolamida (DIPA) y metildietanolamina (MDEA) (Ramírez, 2007).

- **Solventes físicos:** Cuando los gases ácidos no son rentables de tratar con procesos como el anterior, se suelen emplear solventes físicos, donde los gases ácidos simplemente se absorben en el líquido y se asimilan reduciendo la presión (Ramírez, 2007).
- **Agua:** La absorción de gases ácidos en agua genera soluciones corrosivas que deben ser tratadas. La solubilidad del H_2S en agua vendrá dada por la constante de Henry (Ramírez, 2007).
- **Procesos con membranas:** Generalmente no se emplean membranas para el tratamiento selectivo de H_2S del biogás, pero está siendo un proceso atractivo para aumentar la calidad de biogás (Ramírez, 2007).

2.3.2 Uso de microorganismos para la producción de biogás

Son métodos que se han venido desarrollando e investigando con la finalidad de reducir o eliminar las trazas de H_2S en la producción de biogás de alta pureza siendo económicos, amigables con el ambiente, ya que no requieren disposición final.

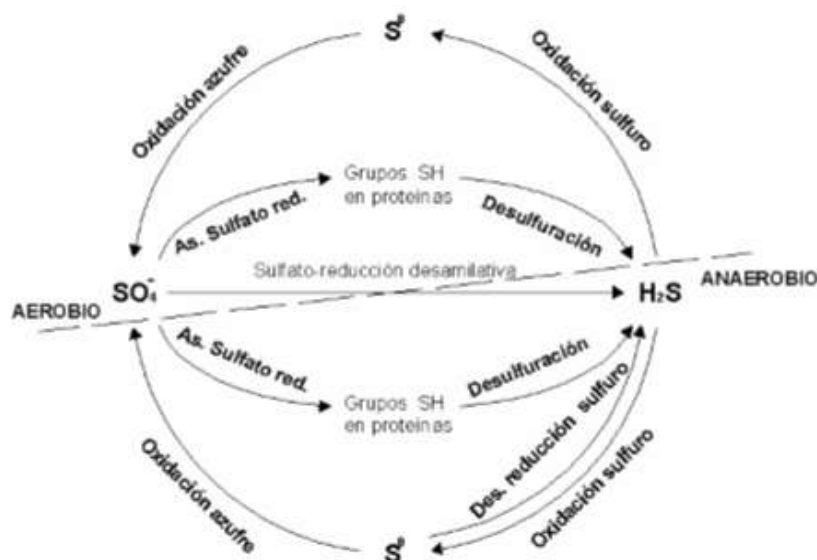
La eliminación biológica de los sulfuros se basa en las actividades de las bacterias fotoautotróficas o quimiolitotróficas que oxidan el azufre. Las bacterias oxidantes de azufre (SOB), obtienen energía para su metabolismo a partir de energía lumínica, y SOB quimiolitotróficos directamente de las reacciones oxidantes, donde utilizan oxígeno (especies microbianas aerobias) o nitratos o nitritos (especies microbianas anoxicas) sirven como aceptor de electrones liberados durante la oxidación de sulfuros. Desde el punto de vista tecnológico, para la eliminación biológica de sulfuros, las más apropiadas son las bacterias quimiolitotróficas oxidantes de azufre (también conocidas como bacterias oxidantes de azufre incoloras), como *Thiobacillus*, *Sulfolobus*, *Thermothrix*, *Beggiatoa* y *Thiothrix*. Estas bacterias son particularmente adecuadas debido a que presentan una mayor tasa de oxidación de sulfuros, por sus modestos requerimientos nutricionales y afinidad extremadamente alta para sulfuros y oxígeno. Estas propiedades les permiten competir con éxito la oxidación química de sulfuros en el medio ambiente natural y biorreactores con un suministro limitado de oxígeno (Janssen et al., 1998).

2.3.2.1 Características del proceso de oxidación de H_2S con microorganismos.

Los microorganismos en la producción de biogás de alta pureza cumplen un gran papel, al oxidarlas trazas de H_2S , estos microorganismos tienen un papel fundamental en el ciclo biogeoquímico del azufre. El azufre existe en nueve estados de oxidación desde 6 hasta -2. Sin embargo, solo tres estados de oxidación son abundantes en la naturaleza: -2 en forma de anión hidrosulfito (HS^-), 0 en forma de azufre elemental ($^{\circ}S$) y 6 en forma de sulfato ($SO_4^{=}$), estando en los océanos la mayor reserva de azufre en forma de sulfato inorgánico (Brüser et al., 2000). El

azufre va cambiando de estado de oxidación en la naturaleza, debido a transformaciones por procesos químicos, geológicos y biológicos. El ciclo biológico del azufre está representado en la Ilustración 1. La oxidación biológica del sulfuro de hidrógeno a sulfato es una de las reacciones principales del ciclo global del azufre. Los compuestos de azufre inorgánicos reducidos son oxidados exclusivamente por procariotas, siendo el sulfato el producto principal de la oxidación (Friedrich et al, 2001).

Ilustración 1. Ciclo biogeoquímico del azufre



. Fuente: <https://www.estrucplan.com.ar/Producciones/imprimir.asp?IdEntrega=3554>

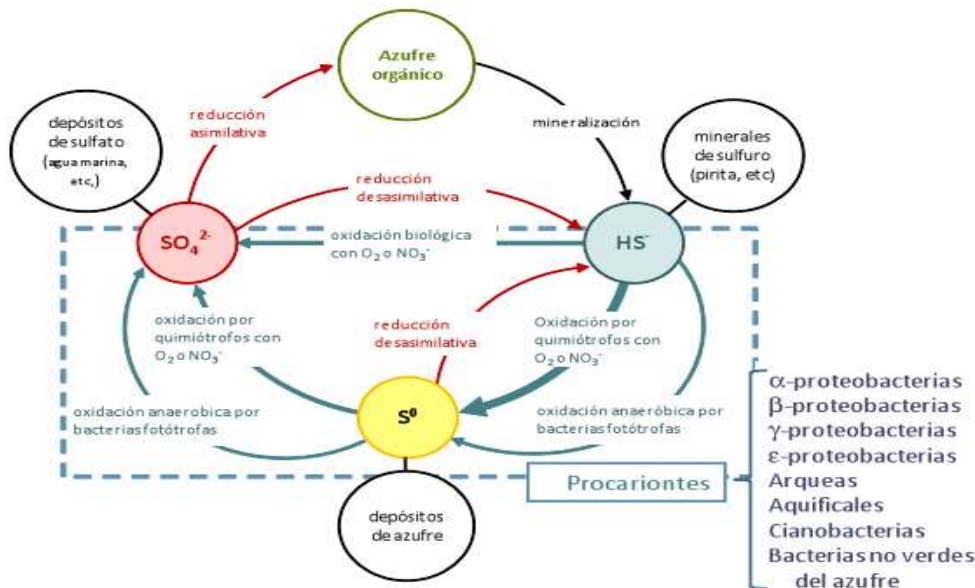
2.3.2.2 Características de los microorganismos oxidadores de H₂S.

Los microorganismos procariontes sulfoxidantes son filogenéticamente diversos. En el dominio bacteria existen oxidadoras de azufre tanto aerobias como anaerobias que pueden crecer en condiciones alcalinas, neutras o ácidas. Las bacterias aerobias azufre oxidantes pertenecen a los géneros *Acidianus*, *Acidithiobacillus*, *Aquaspirillum*, *Aquifex*, *Bacillus*, *Beggiatoa*, *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Starkeya*, *Sulfolobus*, *Thermithiobacillus*,

Thiobacillus y *Xanthobacter*, siendo muchas de ellas extremófilas. Las bacterias anaerobias azufre oxidantes son comúnmente neutrófilas y mesófilas, y pertenecen a los géneros *Allochromatium*, *Chlorobium*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodovulum* y *Thiocapsa* (Friedrich et al., 2001).

De otra parte, *Choloribium limicola* (bacteria fotoautótrofa anaerobia) es capaz de oxidar H_2S a azufre elemental con presencia de CO_2 , luz y un medio con nutrientes inorgánicos (Syed et al., 2003). La oxidación de compuestos inorgánicos reducidos de azufre por bacterias quimiolitautótrofas es parte fundamental del ciclo biogeoquímico del azufre en el medio ambiente. Además, este tipo de reacciones tienen importancia en el tratamiento de la contaminación por compuestos de azufre, en corrosión y en minería. La ilustración 2 muestra un árbol filogenético de bacterias quimiolitautótrofas sulfoxidantes construido a partir de la comparación de secuencias del gen 16S rRNA y con énfasis en aquellas bacterias de importancia práctica. En cuanto al dominio Arquea, el grupo de oxidadoras de azufre está restringido a los miembros del orden *Sulfolobales* (hipertermófilas), (Espinosa, 2010). En la Ilustración 2 se muestra una representación gráfica de los grupos filogenéticos asociados con la oxidación de azufre.

Ilustración 2. Árbol filogenético de bacterias quimiolitotróficas sulfoxidantes



Fuente: http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje_Bioq10v34p101-

120 SylvieLeBorgne2010.pdf

2.3.2.3 Características fisiológicas las bacterias sulfoxidantes

La mayoría de las bacterias sulfoxidantes usan oxígeno molecular (O_2) como aceptor final de electrones. Algunas especies, como *Thiobacillus denitrificans*, son también capaces de usar nitrato (NO_3^-) en condiciones anaerobias como aceptor final de electrones. Las fuentes de donadores de electrones inorgánicos son diversas y abundantes en la naturaleza; pueden ser de origen geológico, biológico y antropogénico. La actividad volcánica es una importante fuente de compuestos inorgánicos reducidos de azufre, al igual que la sulfatorreducción. Las actividades derivadas de la agricultura y minería, así como la quema de combustibles fósiles y otras actividades industriales liberan compuestos inorgánicos reducidos de azufre al medio ambiente, los cuales pueden ser

utilizados como donadores de electrones por las bacterias quimiolitotróficas sulfoxidantes de acuerdo a la información que se presenta la Tabla 3 (Espinosa, 2010).

Tabla 3. Características fisiológicas de algunas bacterias sulfoxidantes

Organismo	T óptima (°C)	pH óptimo	Gránulos de azufre	Importancia
Bacterias de Gram positivas.	40	1.2-2.4	No reportado	Extracción de metales en minería
Diversas especies de <i>Sulfobacillus</i> sp.				
Betaproteobacteria <i>Thiobacillus</i> <i>denitrificans</i>	40	6.8 – 7.4	Extracelulares, finamente dispersados	Tratamiento de la contaminación de aguas por compuestos de azufre y nitratos en condiciones anóxicas.
Betaproteobacteria <i>Thiobacillus</i> <i>thioparus</i>	40	6.8	Extracelulares	Tratamiento de emisiones gaseosas contaminadas con azufre.

Gammaproteobacteria	25-30	2 - 6	Extracelulares	Drenaje ácido de minas, extracción de metales, corrosión de metales y concreto.
<i>Acidithiobacillus</i> <i>ferrooxidans</i>				
Gammaproteobacteria				Drenaje ácido de minas, extracción de metales, corrosión de concreto.
<i>Acidithiobacillus</i> <i>thiooxidans</i>	25-30	2 - 5	Extracelulares	
Gammaproteobacteria	25-30	7.5 -	Extracelular	Tratamiento de biogás y emisiones gaseosas
<i>Thioalkalivibrio</i> sp.		10.5		contaminadas con azufre.

Fuente: Espinosa, 2010

El S⁰ puede ser formado por diversas bacterias sulfoxidantes como se indica en la Tabla 3. El S⁰ producido por estos microorganismos puede almacenarse en gránulos de azufre, situados dentro o fuera de la célula. Los gránulos de azufre excretados son partículas coloidales estabilizadas contra la agregación por repulsión electrostática. El S⁰ formado tiene algunas propiedades que lo diferencian claramente con respecto al S⁰ inorgánico. La densidad de las partículas es, por ejemplo, más baja que la densidad del azufre inorgánico y las partículas de azufre producidas biológicamente tienen características hidrofílicas mientras que el azufre ortorrómbico (S8) se conoce por ser hidrofóbico (Espinosa, 2010).

2.4 Antecedentes de aislamiento de microorganismo oxidadores de azufre

En los últimos años se han realizado diferentes estudios donde se ha reportado aislamiento de microorganismo oxidadores de azufre, tal es el caso de la cepa BDA453^T, que fue aislada de un manantial termal en Fukushima, Japón. Esta cepa pertenece a la familia *Halothiobacillaceae* y está relacionado con los géneros *Halothiobacillus* y *Thiovirga*, y de acuerdo al análisis del gen 16S rRNA se determinó que esta cepa es un nuevo género denominado *Thiofaba tepidiphila*. Esta bacteria tiene la capacidad de utilizar especies reducidas del azufre entre las que se encuentra el tiosulfato, azufre elemental, sulfuro y tetratiónato como donadores de electrones en su proceso de respiración y emplea dióxido de carbono como fuente de carbono. Las condiciones óptimas de crecimiento de esta bacteria fueron 45 °C y pH 6,5 (Mori et al., 2008).

Por otro lado, se reportó el aislamiento, a partir de una fosa subterránea de almacenamiento de crudo en Kuji, Japón, de una bacteria anaerobia facultativa, quimiolitotófica y oxidadora de azufre. El análisis filogenético reveló que esta cepa es un nuevo género de la familia *Helicobacteraceae* y fue designada como *Sulfuricurvum kujiense*. Esta bacteria puede emplear para su crecimiento azufre elemental, tiosulfato e hidrógeno como donadores de electrones y nitrato como aceptor de electrones en condiciones anaerobias. Además, también puede crecer en presencia de oxígeno bajo condiciones microaerófilas (Kodama et al., 2004).

De igual forma, se reportó un estudio sobre una bacteria termofílica, denominada cepa CR11^T, aislada de un manantial termal en las estribaciones del sudoeste del volcán Rincón en Costa Rica. La cepa CR11^T está relacionada con la familia *Thermocrinis* y se le designó como *Thermocrinis minervae*, las condiciones óptimas de crecimiento de la cepa son una temperatura de

75°C y un pH de 5,9, y tiene un crecimiento quimiolitotrófico en presencia de S^0 , $S_2O_3^{2-}$ o H_2 como donador de electrones y con O_2 como único aceptor de electrones (Caldwell et al., 2010).

Así mismo, Liu et al (2006) reportaron el aislamiento de *Paracoccus sulfuroxidans* a partir de una muestra de lodos activado de un biorreactor de tratamiento de aguas residuales. Esta bacteria presenta un crecimiento hetero-organotrófico y quimiolitotrófico, usando sulfuro reducido como recurso energético. (Liu et al., 2006). Por otro lado, Sorokin et al. (2012) reportaron el aislamiento de la cepa HL-EbGr7^T a partir de un biorreactor a gran escala que eliminaba H_2S del biogás bajo condiciones de oxígeno limitado, y la cepa ALJ17^T aislada de un lago de soda en Kenia. Estas cepas pertenecen a la familia *Gammaproteobacteria* y se designaron como una nueva especie del género *Thioalkalivibrio sulfidiphilus*. Estas cepas son alcalófilas y presentan un metabolismo quimiolitotrófico donde utilizan la oxidación del azufre para la asimilación autotrófica de CO_2 . El crecimiento quimiolitotrófico se observó con sulfuro y tiosulfato en un rango de pH de 8,0-10,5 (Sorokin et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar y seleccionar microorganismos oxidadores de ácido sulfhídrico para su potencial uso en la producción de biogás de alta pureza.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar diferentes estrategias de cultivo para aislar microorganismos oxidadores de H₂S de manantiales termales, aguas residuales y aguas de explotaciones mineras.

Aislar y caracterizar fenotípicamente las cepas aisladas de manantiales termales, aguas residuales y aguas de explotaciones mineras.

Determinar la capacidad de oxidación de H₂S de las cepas aisladas a partir de las diferentes fuentes de aislamiento.

Identificación de la estrategia de inmovilización adecuada para las cepas seleccionadas

4. METODOLOGÍA

4.1 Diseño de la investigación

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Sede José Celestino Mutis de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD).

4.1.1 Población de estudio y muestra

La población de estudio fueron los microorganismos oxidadores de H_2S presentes en un manantial termal ubicado en Tabio, Cundinamarca, en aguas residuales provenientes de industria de metalmecánica, y aguas de explotaciones mineras localizadas en el municipio de Mongui y Paz del Río del departamento de Boyacá. En la Tabla 4 se presenta la descripción de los sitios de muestreo evaluados en este estudio.

Tabla 4. Descripción de los sitios de muestreo.

Tipo de muestra	Ubicación	Nomenclatura
Aguas de manantiales termales	Tabio, Cundinamarca	AMT
Aguas producto minero	Mina Paz de Rio,	AMR

	Boyacá	
Aguas productos mineros	Mina Sanoa,	AMS
	Boyacá	
Aguas producto minero	Mina Peña,	AMP
	Boyacá	
Aguas residuales industria	Bogotá,	ARMC
metalmecánica	Cundinamarca	
<hr/>		
<i>Fuente. Autor 2017</i>		

4.2 Métodos

4.2.1 Recolección de muestras

Las muestras se recolectaron en recipientes plásticos estériles de 10 ml y 600 ml, y se transportaron a temperatura ambiente para su posterior análisis en el laboratorio (Ilustración 3).

Ilustración 3. Recolección de muestras aguas mineras y de manantial termal



Fuente. Autor 2017

4.2.2 Estrategias de aislamiento

Para el aislamiento de los microorganismos oxidadores de H_2S a partir de los sitios de muestreo analizados, se evaluaron diferentes tipos de medios de cultivo. En la Tabla 5 y 6 se muestra la composición de los medios de cultivo empleados

Tabla 5. Composición Medio Básico 1.

Medio de cultivo	Cantidad por litro
K_2HPO_4	2,0 g
NH_4Cl	0,4 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,2 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 g

Peptona	2,0 g
---------	-------

Fuente: (Cho et al, 1992)

Tabla 6. Composición Medio Básico 2.

Medio de cultivo	Cantidad por litro
(NH ₄) ₅ SO ₄	3,0 g
KH ₂ PO ₄	6.0 g
K ₂ HPO ₄	2,4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.15 g
CaSO ₄	0.15 g
FeSO ₄	0,03 g
Peptona	2,0 g

Fuente: Ramírez et al. 2009

Los medios de cultivos se incubaron a 37 °C, el pH y el efecto de las diferentes estrategias de aislamiento evaluadas sobre el crecimiento de microorganismos oxidadores de H₂S se determinó

evaluando la densidad microbiana, mediante observación en el microscopio óptico.

4.2.3 Inoculación.

Para el crecimiento de microorganismos oxidadores de H_2S se inoculó 1 ml de cada una de los sitios de muestreo analizados, en los diferentes medios de cultivo evaluados. Los criterios que se tuvieron en cuenta para determinar los tubos positivos fueron: visualización del aumento de la turbidez del medio, verificación microscópica del crecimiento del microorganismo en el medio líquido utilizando el microscopio óptico y observación de presencia de colonia en los medios sólidos (Ilustración 4).

Ilustración 4. Incubación medios de cultivo sólido y líquido



Fuente. Autor 2017

4.2.4 Aislamiento

A partir de los tubos que presentaron una alta densidad bacteriana se realizaron los aislamientos

en medio sólido con el fin de obtener cepas puras. Las cepas aisladas se purificaron a través del uso repetido de esta técnica hasta obtener cultivos axénicos.

4.2.5 Caracterización fenotípica

Las cepas aisladas se caracterizaron fenotípicamente evaluando características macroscópicas, morfología, coloración de Gram, presencia de esporas y motilidad.

4.2.5.1 Morfología

Para el estudio de la morfología se utilizó un microscopio óptico (Nikon), que permitió determinar la forma de las células, coloración de Gram, motilidad y presencia y posición de las esporas.

Coloración de Gram

La coloración de Gram se realizó siguiendo el protocolo Hucker (1965). Se utilizó *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* como controles (Rubiano, 2006).

4.2.6 Evaluación de la capacidad de oxidación de H₂S de los microorganismos aislados

Para determinar la capacidad de oxidación de H_2S , las cepas fueron sub-cultivadas dos veces bajo las mismas condiciones experimentales (Ilustración 5). La evaluación de la capacidad de oxidación de H_2S se realizó por triplicado. En esta prueba las cepas fueron incubadas a 30°C durante 7 días, suplementadas con $^\circ\text{S}$ 10 g/L. La oxidación de H_2S se determinó mediante la cuantificación de sulfatos.

Ilustración 5. Sub-cultivo de las cepas seleccionadas



Fuente. Autor 2017

El sulfato (SO_4^{2-}) se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y puede estar presente en aguas naturales en concentraciones que van desde unos pocos miligramos por litro hasta algunos gramos por litro (IDEAM 2007). El ion (SO_4^{2-}) forma una suspensión con cloruro de bario (BaCl_2) en presencia de ácido acético para formar cristales de sulfato de bario (BaSO_4) de tamaño uniforme. En esta técnica se mide la dispersión de luz de la suspensión de BaSO_4 con un turbidímetro, y la concentración de (SO_4^{2-}) se determina por comparación de la lectura contra una curva estándar (IDEAM, 2007). A continuación, se describe el protocolo seguido para la determinación la capacidad de oxidar azufre de las cepas aisladas:

Cada uno de los cultivos de las cepas aisladas se sometieron a un proceso de centrifugación a 6000 rpm durante 30 min, esto con el fin de evitar que residuos sólidos interfirieran en el proceso de análisis. El sobrenadante obtenido de cada muestra (150 ml) se transfirió a un frasco estéril. Posteriormente, se tomaron 50 ml de alícuota de cada muestra, y se adicionaron 10 ml de solución Buffer A, luego se sometió a agitación magnética permitiendo que se homogenizara la solución y se adicionó 1ml de la solución en una celda para realizar la lectura inicial en el turbidímetro (HI 88713-ISO, HANNA Instruments).

Posteriormente, se adiciono una cucharada de cristales de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y se dejó en agitación por 60 s a velocidad constante, y se dejó en reposo durante 5 minutos. Finalmente, se realizó la lectura en el turbidímetro y se registraron los datos de turbidez final (Ilustración 6). Los resultados obtenidos fueron reemplazos en la siguiente fórmula:

$$\text{MgSO}_4/\text{L} = ((\text{NTUf} - \text{NTUi}) - \text{Intercepto}) / \text{pendiente de la curva} * \text{FD}$$

Donde

To: Tiempo inicial

Tdt: Tiempo después de adicionar el tampón

Tf: Tiempo final después de adicionar el BaCl_2

NTUf = Turbiedad final

NTUi = Turbiedad inicial

Intercepto: Intercepto con el eje de las ordenadas

FD = Factor de Dilución

La curva estándar se realizó usando soluciones de SO_4 de 100 – 1000 mg SO_4 disueltas en agua destilada (Anexo 1).

Ilustración 6. Cuantificación de sulfatos de las cepas aisladas



Fuente. Autor 2017

4.2.7 Evaluación de diferentes matrices para la inmovilización de las cepas seleccionadas

Una vez determinada la capacidad de oxidación de H_2S de los microorganismos evaluados se procedió a realizar la evaluación de diferentes matrices para la inmovilización de las dos cepas que presentaron mayor oxidación de sulfato, con el fin de seleccionar la matriz de células inmovilizadas que permita una mayor eficiencia de remoción de H_2S . Las matrices evaluadas en este estudio fueron el bagazo de caña de azúcar y el carbón activado (Ilustración 7). La inmovilización de las cepas seleccionadas se realizó siguiendo el protocolo descrito por (Ma et al. 2006), el cual se describe a continuación. Las cepas seleccionadas fueron cultivadas en 50 ml de Medio Básico 1 durante 3 días y luego la biomasa microbiana se recolectó por centrifugación a

6000 g por 10 min. Posteriormente, la biomasa recolectada se colocó en un Erlenmeyer de 250 ml que contenía 100 ml de Medio Básico 1 y 40 g de bagazo de caña de azúcar o carbón activado, permitiendo la unión entre el microorganismo y la matriz (Ilustración 7). Transcurridos 15 días de incubación, se evaluó la eficiencia de remoción de H_2S en cada una de las matrices con las células inmovilizadas obtenidas, a partir de la cuantificación de sulfatos descrita anteriormente (Ilustración 8) (Ma et al. 2006).

Ilustración 7. Matrices evaluadas para la inmovilización de las cepas seleccionadas



Fuente. Autor 2017

Ilustración 8. Cuantificación de sulfatos de las cepas seleccionadas



Fuente. Autor 2017

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estrategias de aislamiento de microorganismos oxidadores de H₂S

Para el aislamiento de los microorganismos oxidadores de H₂S presentes en las muestras de aguas de manantiales termales, aguas residuales de minería y aguas de la industria de metalmecánica, se evaluaron como estrategias de incubación dos medios de cultivo, Medio Básico 1 y Medio Básico 2, con el fin de determinar el medio de cultivo que permitía una mayor recuperación de microorganismos oxidadores de H₂S. Los medios de cultivos empleados se caracterizaban por ser un medio oligotrófico suplementado con azufre elemental (°S), con el fin de asegurar el aislamiento de microorganismos con capacidad de oxidación de H₂S.

Los medios de cultivo evaluados se inocularon con las diferentes muestras analizadas en este estudio y se incubaron a 37°C. Después de 2 semanas de incubación se evidenció crecimiento en 17 cepas, determinando que los dos medios de cultivo empleados permitían un crecimiento similar de los microorganismos, siendo así que a partir del Medio Básico 1 se aislaron 9 cepas y en el Medio Básico 2 se aislaron 8 cepas. En la Tabla 7 se encuentra la distribución de las cepas aisladas de acuerdo al medio de cultivo empleado.

El azufre elemental (°S) está frecuentemente presente en todos los organismos y se produce en compuestos orgánicos tales como aminoácidos, proteínas, enzimas, antibióticos y grasas. Está presente en sustancias orgánicas con funciones catalíticas, estructurales y reguladoras.

Por el contrario, la función biológica de los compuestos de azufre inorgánicos es limitada. Estos compuestos sirven como fuente de azufre para la asimilación y síntesis de compuestos orgánicos, o se usan como aceptores de electrones o donantes en procesos de desasimilación. La reducción asimilativa del sulfato es común en procariotas, plantas y hongos. Las vías de desasimilación son utilizadas principalmente por microorganismos de los dominios Bacteria y Archaea (Pokorna, 2015).

Respecto al aislamiento de microorganismos oxidadores de azufre se han realizado varios estudios donde se reporta el uso de $^{\circ}\text{S}$ como estrategia para su aislamiento. Dentro de estos estudios se encuentra la investigación realizada por el Centro de Recursos Biológicos del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE) en Japón, donde se aisló una bacteria oxidadora de azufre empleando un medio de cultivo suplementado con azufre elemental a partir de un manantial termal en Fukushima, Japón, de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se determinó que esta cepa es quimiolitotrófica, por tal motivo obtiene la energía para su crecimiento mediante la oxidación de azufre y la fijación de dióxido de carbono (Mori et al., 2008).

Por otro lado, el instituto de Biología de la Universidad de Islandia, aisló las cepas 2268 y 3838 PRI^T a partir de dos fuentes termales situados en la zona geotérmica Torfajökull del sur de Islandia, estas cepas exhibieron crecimiento mixotrófico con la oxidación de azufre, los nuevos aislados representan una nueva especie, denominada *Thermus. Nov* (Bjornsdottir et al., 2009).

De igual forma en el Instituto de Investigación de Recursos y Función Biológica de la Universidad de Hokkaido en Japón, se aisló una nueva bacteria denominada *Thiovirga sulfuroxydans* gen. Nov, mesófila, quimiolitototrófica, oxidante de azufre, denominada cepa SO07T, de una biofilm microaerobia de aguas residuales. Se observó crecimiento quimiolitototrófico con azufre elemental, sulfuro y tiosulfato como únicos donantes de electrones y oxígeno como aceptor de electrones (Ito et al., 2005).

También el laboratorio Estatal de Recursos Microbianos, Instituto de Microbiología, Academia de Ciencias de China, Zhong Guan Cun, aisló una nueva bacteria denominada *Thiovirga sulfuroxydans* gen. Nov, mesófila, quimiolitototrófica, oxidante de azufre, denominada cepa SO07T, de una biofilm microaerobia de aguas residuales. Se observó crecimiento quimiolitototrófico con azufre elemental, sulfuro y tiosulfato como únicos donantes de electrones y oxígeno como aceptor de electrones (Liu et al., 2006).

Tabla 7. Distribución de las cepas aisladas de acuerdo al medio de cultivo empleado

Muestra	Medio de cultivo	No. Cepas aisladas
AMP	Medio básico 2	4
	Medio básico 1	2
AMS	Medio básico 2	0
	Medio básico 1	0
AMR	Medio básico 2	2
	Medio básico 1	4

AMT	Medio básico 1	2
ARMC	Medio básico 2	2
	Medio básico 1	1

5.2 Aislamiento y caracterización de microorganismos oxidadores de H₂S

Mediante el uso de las estrategias de cultivo empleadas en este estudio se aislaron un total de 17 cepas, 6 cepas de las minas Monguí, 6 cepas de las minas Paz del Rio, 2 cepas del manantial termal de Tabio y 3 cepas de aguas residuales de la industria de metalmecánica. La caracterización fenotípica de cada una de las cepas aisladas incluyó la descripción macroscópica de las colonias, la descripción microscópica de la forma de las células, la coloración de Gram, la presencia o ausencia de esporas y la motilidad (Tabla 8).

Tabla 8. Caracterización fenotípica de las cepas aisladas

Sitio de muestreo	Cepa	Descripción macroscópica	Descripción microscópica	Motilidad	Presencia de esporas	Tinción de Gram
Aguas industria minera (Mongui)	M1-C1	Colonia blanca, plana, circular y entera. Diámetro 4 mm	Bacilos cortos, delgados	-	-	Gram (+)
	M2-C2	Colonia blanca, elevada, entera y circular. Diámetro 0,2 mm	Bacilos largos, delgados	-	-	Gram (+)
	M2-C3	Colonia blanca, elevada, entera y circular. Diámetro 0,2 mm	Bacilos largos, delgados	-	-	Gram (+)

	M2-C4	Colonia blanca, elevada, entera. Diámetro 2 mm	Bacilos largos, delgados	+	-	Gram (+)
	M3-C1	Colonia blanca, elevada, filamentosa y dentada. Diámetro 1 mm	Bacilos cortos, delgados y se disponen en cadenas	+	+	Gram (+)
	M3-C3	Colonia blanca, elevada, filamentosa y dentada. Diámetro 0,2 mm	Bacilos cortos, delgados	+	-	Gram (+)
	M8-C1	Colonia gris, elevada, circular y elevada	Bacilos cortos, delgados	+	-	Gram (+)

Agua residual
metalmecánica

Manantial termal Tabio	M11-C1	Colonia blanca, circular, elevada y entera. Diámetro 1 mm	Bacilos cortos, delgados y se disponen en cadenas	+	-	Gram (+)
	M15-C1	Colonia blanca, irregular, elevada y ondulada. Diámetro 0,5 mm	Bacilos largos, gruesos y se disponen en cadenas	+	-	Gram (+)
	M13-C3	Colonia amarilla, circular, elevada y entera. Diámetro 0,5 mm	Bacilos largos, gruesos	+	-	Gram (-)
	M13-C2	Colonia amarilla, circular, elevada y entera. Diámetro 0,1 mm	Bacilos cortos, gruesos	+	-	Gram (+)

Aguas industria minera (Paz del río)	M14-C1	Colonia amarilla, circular, elevada y entera. Diámetro 3 mm	Bacilos largos, delgados	-	-	Gram (+)
	M14-C2	Colonia naranja, circular, elevada, entera. Diámetro 5 mm	Bacilos cortos, gruesos	+	-	Gram (+)
	M17-C1	Colonia amarillar, circular, entera y elevada. Diámetro 5 mm	Bacilos cortos, gruesos y se disponen en cadenas	+	-	Gram (+)
	M17-C2	Colonia naranja, circular, elevada, entera. Diámetro 3 mm	Bacilos largos, delgados, no móviles	-	-	Gram (-)

	Colonia blanca,	Bacilos largos, gruesos			
M17-C3	circular, elevada y entera. Diámetro 2 mm	y se disponen en cadenas	-	-	Gram (+)
M18-C1	Colonia amarilla, circular, elevada y entera. Diámetro 6 mm	Bacilos cortos, delgados y se disponen en cadenas	+	-	Gram (+)

De acuerdo a la caracterización fenotípica de las cepas aisladas en este estudio, se evidencia que dentro de las características macroscópicas, la mayoría de colonias son blancas, circulares, elevadas y enteras, en relación con las características microscópicas predomina la presencia de los bacilos cortos, delgados y con disposición en cadenas. En cuanto a la motilidad se evidencia que 11 cepas presentan resultados positivos de motilidad y solo la cepa M3-C1 presento presencia esporas. Con respecto a la coloración de Gram, 15 cepas fueron Gram positivas mientras que 2 cepas fueron Gram negativas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se consultó en diferentes fuentes, sobre estudios relacionados en donde se utilizó aguas provenientes de termales, aguas residuales y aguas de minería, para aislar microorganismos oxidadores de H_2S , encontrando los siguientes estudios:

Entre las cuales se destacan el Centro de Recursos Biológicos del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación, donde la cepa designada BDA453^T, se aisló a partir de una fuente termal en la prefectura de Fukushima, Japón (Mori et al., 2008), de igual forma tres bacterias termófilas, aerobias, por hidrógeno y oxidantes del azufre se aislaron a partir de aguas termales de Islandia cerca del pueblo de Hveragerdi en EE.UU (Flores et al., 2008), también en el departamento de Biología Marina y Oceanografía de Instituto de Ciencias del Mar, aisló una bacteria termófila, designada CR11^T, de una muestra con filamentos recogido de una fuente termal terrestre en las estribaciones sur-oeste del volcán Rincón en Costa Rica (Caldwell, 2010) y en el instituto de Biología de la Universidad de Islandia, Sturlugata, aisló las cepas 2268 y

3838 PRI^T a partir de dos fuentes termales situadas en la zona geotérmica Torfajökull del sur de Islandia (Bjornsdottir, 2009), estos 4 estudios reportaron resultados positivos de oxidación de H₂S.

De igual forma se encontraron resultados positivos en investigaciones sobre bacterias oxidadoras de H₂S aisladas de aguas residuales, en el laboratorio Estatal de Recursos Microbianos del Instituto de Microbiología en China, donde se aisló la cepa LW36^T, a partir de lodos activados de un biorreactor de tratamiento de aguas residuales (Liu, 2006) y en el departamento de Ingeniería Urbana y Ambiental, Facultad de Ingeniería de la Universidad de Hokkaido en Japón, se aisló la cepa SO07^T, de una biopelícula de aguas residuales microaeróbicas (Ito et al., 2005).

Por otro lado, se encontró estudios sobre microorganismos oxidadores H₂S, presentes en aguas residuales procedentes de minería, entre las que se destaca el estudio realizado en Mogongalia Virginia Occidental, donde se analizó muestras de aguas residuales provenientes de minas de carbón, con la finalidad de mostrar que los microorganismos tienen un papel activo en la interrelación anterior y que la formación de ácidos debido a la acción microbiana, en este estudio se utilizó la bacteria *Thiobacillus thiooxidans* (Arthur, 1947), por otro lado en el Laboratorio Estatal de Recursos Microbianos, Instituto de Microbiología, Academia de Ciencias de Beijing, en donde se aisló la cepa ZJ-6^T de la mina de cobre Zi-Jin en Mongolia Interior de China, (Guo et al., 2009) y la Agencia Japonesa de Ciencias Marinas y Tecnología (JAMSTEC), se aisló la cepa denominada C55^T de la mina de oro Hishikari, Japón. (Hirayama et al., 2005).

5.3 Evaluación de la capacidad de oxidación de H₂S de los microorganismos aislados

Para determinar la capacidad de oxidación de H₂S de las cepas aisladas se empleó la técnica de cuantificación de sulfatos. A partir de los resultados obtenidos se determinó que todas las cepas aisladas en este estudio tienen la capacidad de oxidación de H₂S, ya que presentaron valores positivos de sulfato, esto indica que las cepas aisladas tienen la habilidad de utilizar especies reducidas del azufre y oxidarlas hasta sulfato. El promedio de sulfatos cuantificados en las cepas aisladas fue de 12.32 g sulfato/L. Las cepas que presentaron mayor capacidad de oxidación de azufre fueron M14-C2 y M15-C1, las cuales registraron valores de 18.3 g sulfato/L y 15.4 g sulfato/L, respectivamente. En la Tabla 9 se muestra la cuantificación de sulfatos de las cepas aisladas.

Por otro lado, el departamento de Ingeniería Química, Universidad de Xíán Jiaotong de china, de acuerdo a estudios realizados en eliminación biológica de altas concentraciones de H₂S, utilizando los microorganismos *denitrificans Thiobacillus*, donde se evidencia que cuando el tiempo de retención fue cambiado de 30 a 100 segundos, presento una concentración de influente de 100 mg / L de H₂S, las deficiencias de eliminación estaba por encima de 98%; cuando la concentración de entrada de H₂S se cambió de 110 a 120 mg/L, se alcanzó un promedio de eliminación eficiencia de 96,8% durante la operación a largo plazo para el carbón activado en el biorreactor (Ma et al 2006).

De igual forma, en el Instituto de Microbiología de la Academia Rusa de Ciencias de Moscú, Rusia aisló la cepa ALM1^T, con características haloalcalifílica, obligatoriamente autotrófica,

que oxidaban el azufre de la capa de agua de interfaz de oxígeno-sulfuro de alcalino estratificado y salino del lago Mono en California, EE.UU, brindando una alta concentración de sulfato (130 mM) de H₂S, (1mol=gramos/PM, $0.13 \times 34.065 = 4.43$ gr de H₂S),(Sorokin, 2002).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el microorganismo *denitrificans Thiobacillus*, se puede evidenciar que presenta como máximo oxidación 0.12 g/L de H₂S y la cepa ALM1^T 4.43 gr, las dos cepas presentan un rango muy bajo, en comparación con los datos de las 17 cepas analizadas en este estudio, en donde la cepa M17-C1 (R2) presenta la menor oxidación de 10.4 g/L de H₂S y la cepa M15-C1 (R2) la mayor oxidación de 15.4 10.4 g/L de H₂S.

Tabla 9. Cuantificación sulfatos de las cepas aisladas

Muestra	To (NTU)	Tdt (NTU)	Tf BaCl₂ (NTU)	NTU Final	Resultado NTU- b	mg sulfato/L	g sulfato/L
M8 C1 (R1)	8,17	8.94	1089	1081	1080,7	13179,1	13,2
M8 C1 (R2)	8,17	11.0	1054	1046	1045,7	12752,2	12,8
M8 C1 (R3)	8,17	10.7	1091	1083	1082,7	13203,5	13,2
M14 C1 (R1)	15,8	22.2	1160	1144	1144,1	13951,9	14,0
M14 C1 (R2)	15,8	30.3	962	946,2	946,1	11537,2	11,5
M14 C1 (R3)	15,8	26.8	1051	1035	1035,1	12622,6	12,6
M15-C1 (R1)	72,8	75.7	1292	1219	1219,1	14866,5	14,9
M15-C1 (R2)	72,8	76.1	1335	1262	1262,1	15390,9	15,4
M15-C1 (R3)	72,8	72.9	1250	1177	1177,1	14354,3	14,4

M14-C2 (R1)	11,7	13.5	1511	1499	1499,2	18282,4	18,3
M14-C2 (R2)	11,7	14.2	1099	1087	1087,2	13258,0	13,3
M14-C2 (R3)	11,7	13.7	1185	1173	1173,2	14306,7	14,3
M1-C1 (R1)	23,9	26	1078	1054	1054,0	12853,1	12,9
M1-C1 (R1)	23,9	28.2	894	870,1	870,0	10609,2	10,6
M1-C1 (R3)	23,9	28.5	915	891,1	891,0	10865,3	10,9
M17-C1 (R1)	30,1	25.9	963	932,9	932,8	11375,0	11,4
M17-C1 (R2)	30,1	19.4	885	854,9	854,8	10423,8	10,4
M17-C1 (R3)	30,1	27.8	925	894,9	894,8	10911,6	10,9
M17-C2 (R1)	4,31	5.59	1000	995,7	995,5	12140,8	12,1
M17-C2 (R2)	4,31	6.74	1106	1102	1101,5	13433,5	13,4
M17-C2 (R3)	4,31	33	1066	1062	1061,5	12945,6	12,9

M18-C1 (R1)	14,3	13.5	873	858,7	858,6	10470,2	10,5
M18-C1 (R2)	14,3	8.1	1020	1006	1005,6	12262,8	12,3
M18-C1 (R3)	14,3	6.59	973	958,7	958,6	11689,7	11,7

To: Tiempo inicial

Tdt: Tiempo después de adicionar el tampón

Tf: Tiempo final después de adicionar el BaCl₂

5.4 Evaluación de diferentes matrices para la inmovilización de las cepas seleccionadas

En la Tabla 10 se evidencia la cuantificación de sulfato de las cepas M14-C2 y M15-C1 en presencia de las matrices de inmovilización evaluadas. De acuerdo a los resultados obtenidos se evidencia que el bagazo de caña de azúcar permite una mayor oxidación de azufre de las cepas seleccionadas, observándose una cuantificación de sulfato de 23,92 g sulfato/L (promedio) para la cepa M14-C2 y 24,15 g sulfato/L (promedio) para la cepa M15-C1. En el caso del carbón activado la oxidación, se evidencia muy baja oxidación de azufre, en la cepa M14-C2 se registró una concentración de sulfato por debajo de 1 g sulfato/L mientras que en la cepa M15-C1 la concentración de sulfato fue inferior a 7 g sulfato/L.

En este estudio se evaluaron el carbón activado y el bagazo de caña de azúcar, con el fin de determinar que matriz permite una mayor eficiencia de oxidación de H_2S de las cepas seleccionadas, M14-C2 y M15-C1.

El bagazo de caña de azúcar, se escogió por ser un material residual de la caña de azúcar que está constituido por cuatro fracciones de fibra o bagazo (45 %), sólidos no solubles (2–3%), sólidos solubles (2–3 %) y agua (49 –51%), permite que sean empleadas en diferentes procesos industriales, entre los que se destaca la producción de papel, combustible en la industria azucarera, producir pulpa, productos aglomerados, entre otros (Aguilar, 2011).

De igual manera el artículo del Diario de ingeniería química “El Sevier”, publica una investigación de tres materiales de empaque (espuma de poliuretano, bagazo de caña de azúcar y fibra de coco) para la biofiltración de una mezcla gaseosa que contiene sulfuro de

hidrógeno (H_2S), donde se concluyó que los materiales de embalaje ensayados en este trabajo son apropiados para la biofiltración a largo plazo del sulfuro de hidrógeno. (Pantoja et al., 2010).

Por su parte, el carbón activado posee una capacidad de adsorción elevada y se utilizan para la purificación de líquidos y gases. La adsorción sobre carbón activado es selectiva, ya que favorece a las sustancias no polares sobre las polares. Comparado con otros adsorbentes comerciales, tiene un amplio espectro de actividad adsorbente, excelente estabilidad física y química, y facilidad de producción a partir de sustancias fáciles de adquirir, con frecuencia materiales de desecho (EcuRed, 2017). De igual forma el carbón activado se ha utilizado para varios estudios como matriz de inmovilización, entre los que se encuentra, la eliminación biológica de altas concentraciones de H_2S , utilizando bacterias *Thiobacillus denitrificans* inmovilizadas con carbón activado granular (GAC), como materiales de empaque para inmovilizar *Thiobacillus denitrificans* para la eliminación de H_2S , en este estudio se investigaron los factores que afectan al proceso de biodesulfuración como adsorción física de la matriz, tiempo de retención y caída de presión en el sistema de inmovilización y la capacidad del biorreactor para amortiguar la carga y la eficiencia de remoción en el funcionamiento a largo plazo usando biorreactores de células inmovilizadas. Los resultados del experimento demostraron que el biorreactor GAC tenía un potencial significativo para tratar el olor del de H_2S , ya que GAC proporciona una superficie más uniforme y buena resistencia a la trituración, lo que permite un mejor control operacional en áreas con capacidad de adsorción de gas, distribución de gas y caída de presión. Además, el GAC proporcionó una mayor capacidad de adsorción bacteriana (Ma et al 2006).

Teniendo en cuentas estos estudios, se puede evidenciar que tanto el carbón activado, como el bagazo de caña de azúcar han sido utilizados como matriz de inmovilización, presentando resultados positivos de oxidación de H_2S , debido a las propiedades que cada uno de estos compuestos tiene, lo que permiten que estos microorganismos puedan tener un buen desarrollo.

Tabla 10. Cuantificación de sulfatos de las cepas M14-C2 y M15-C1 inmovilizadas en bagazo de caña de azúcar y carbón activado

Matriz	Cepa	To (NTU)	Tdt (NTU)	Tf BaCl ₂ (NTU)	NTU Final	Resultado NTU- b	mg sulfato/L	g sulfato/L
Carbón activado	M14-C2	7,51	7,2	17,84	10,33	10,18	124,18	0,12
	(R1)							
	M14-C2	7,51	7,18	23,43	15,92	15,77	192,35	0,19
	(R2)							
	M15-C1	2,8	2,28	564	561,2	561,05	6842,11	6,84
	(R1)							
Bagazo de caña	M15-C1	2,8	3,31	532	529,2	529,05	6451,87	6,45
	(R2)							
	M14-C2	17,6	24,1	1983	1965,4	1965,25	23966,50	23,97
	(R1)							
	M14-C2	17,6	18,9	1975	1957,4	1957,25	23868,94	23,87
	(R2)							

M15-C1	4,31	16,9	1995	1990,69	1990,54	24274,91	24,27
(R1)							
M15-C1	4,31	13,7	1975	1970,69	1970,54	24031,01	24,03
(R2)							

Por otra parte, en la Ilustración 9 se presenta la gráfica de comparación de la cuantificación de sulfatos de las cepas M14-C2 y M5-C1 sin y con inmovilización. De acuerdo al análisis de la gráfica se observa que en presencia de la matriz de carbón activado la cuantificación de sulfatos de las cepas seleccionadas disminuye significativamente en comparación con los resultados obtenidos sin inmovilizar las cepas, esto sugiere que probablemente el carbón activado afecta la capacidad de oxidación de especies reducidas del azufre. Por su parte, en presencia de la matriz de bagazo de caña las cepas M14-C2 y M14-C1 aumentan significativamente la concentración de sulfato producido en comparación con las concentraciones de sulfato obtenidas sin inmovilizar las cepas, indicando que posiblemente esta matriz contribuye a potencializar la capacidad de oxidación de azufre de las cepas M14-C2 y M5-C1.

De acuerdo a estudios realizados en eliminación biológica de altas concentraciones de H_2S , utilizando los microorganismos *denitrificans Thiobacillus*, se ha utilizado como matriz de inmovilización el carbono activado granular (GAC). Los resultados mostraron que GAC, se evidencio que las bacterias tenían mayor capacidad de adsorción, mostro mayor resistencia a cargas de choque y permitió un mejor control operacional con respecto a la caída de presión, concentración de influente de 100 mg/L de H_2S , se encontró que la tasa de eliminación máxima y la constante de media saturación eran $666,7 \text{ mg } (H_2S) / (L \cdot d)$ y $20,8 \text{ mg / L}$. (Ma et al. 2006).

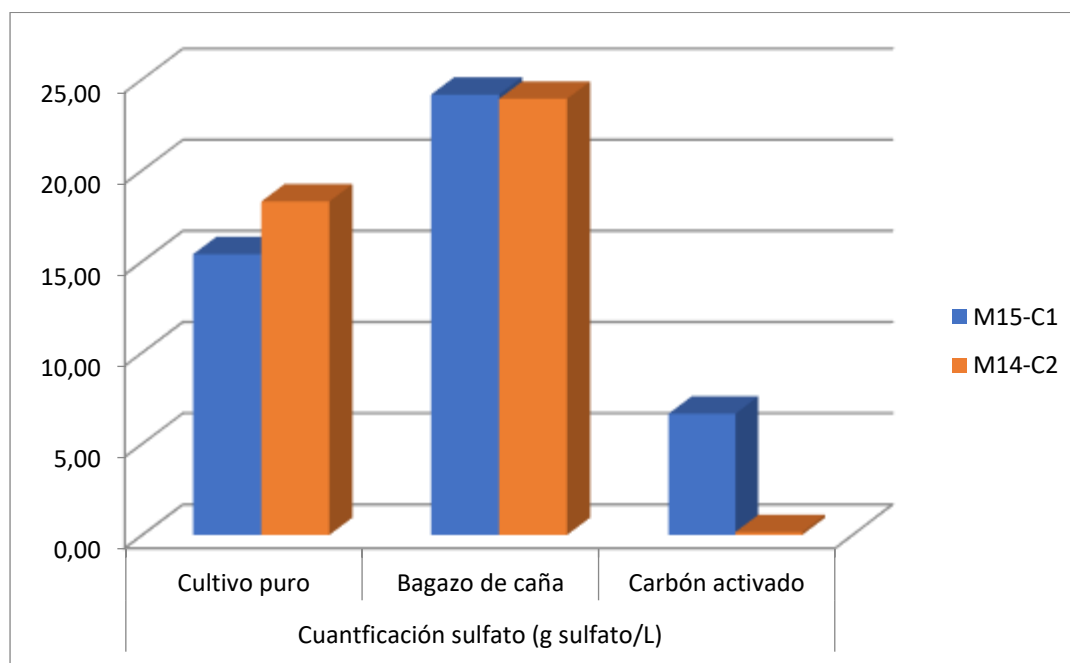
Teniendo en cuenta los resultados del análisis con carbón activado granular como matriz de inmovilización, utilizando los microorganismos *denitrificans Thiobacillus* se observó que la oxidación fue de 0.1 g sulfato/L, de acuerdo a estos resultado, se evidencia que tiene mayor capacidad de oxidación que la cepa M14-C2 donde se obtuvo un promedio de 0.155 g

sulfato/L y menor en comparación con la cepa M15-C1 donde el promedio fue 6.645g sulfato/L.

De igual forma en cuanto al bagazo de caña de azúcar se utilizó para un estudio a través de la biofiltración de una mezcla gaseosa que contiene sulfuro de hidrógeno (H_2S). Se obtuvieron cultivos mixtos a partir de dos fuentes, biofiltros sumergidos aireados y lodos activados, y se utilizaron como inóculos. Los biofiltros alcanzaron una eficiencia de remoción del 100% después de dos días de operación. El tiempo de residencia en el lecho vacío fue de 49 segundos para cada uno de los biofiltros. Los reactores fueron operados simultáneamente y las concentraciones de entrada de H_2S variaron entre 184 y 644 ppmv durante el funcionamiento continuo a largo plazo de los biofiltros (100 días), (Pantoja, 2010).

De acuerdo a los resultados obtenidos con el bagazo de caña de azúcar en el estudio de biofiltración de (Pantoja, 2010), los resultados están en rangos de 0,184 y 0,644 g sulfato/L de oxidación de H_2S , es un resultado muy bajo en comparación con la cepa M14-C2 que presento un promedio de 23,92 g/l y con la cepa M15-C1 donde el promedio fue 24,15g sulfato/L.

Ilustración 9. Comparación de la cuantificación de sulfato (g sulfato/L) de las cepas M14-C2 y M15-C1 en ausencia y presencia de matriz de inmovilización



Los resultados obtenidos de la investigación permiten demostrar que las matrices empleadas para la inmovilización fueron capaces de oxidar H_2S para las condiciones experimentales evaluadas, al obtener en promedio 0,12 a 6,84 g sulfato/L para el carbón activado y 23,87 a 24,27 g sulfato/L para el bagazo de caña de azúcar, con una diferencia significativa, lo que permite afirmar que el bagazo de caña de azúcar tiene potencial significativa como matriz inmovilización, convirtiéndose en una guía para el futuro diseño y operación de este sistema a escala industrial.

6. CONCLUSIONES

Se emplearon dos medios de cultivo como estrategia para aislar microorganismos oxidadores de H_2S de manantiales termales, aguas residuales de explotaciones mineras y aguas residuales de metalmecánica, los cuales permitieron el aislamiento de bacterias oxidadoras de azufre.

Se aislaron 17 cepas oxidadoras de H_2S , a las cuales se realizaron observaciones fenotípicamente de cada una de las cepas aisladas, evidenciándose las características macroscópicas y microscópicas, dentro de las que se destaca la morfología, coloración de Gram, presencia de esporas y motilidad.

Todas las cepas aisladas tienen la capacidad de oxidar especies reducidas de azufre, presentando los valores promedios de oxidación de 2.83 g sulfato/L.

De las 17 cepas que se analizaron, se evidencio que los resultados más altos de oxidación se presentaron en la cepa M14-C2 18.3 g sulfato/L y la cepa M15-C1 15.4 g sulfato/L.

De acuerdo a los resultados finales obtenidos, se evidencio que el bagazo de caña de azúcar como matriz de inmovilización de las cepas M14-C2 y M15-C1, brindo excelentes condiciones de desarrollo de los microorganismos, obteniendo un promedio de oxidación de 24,035 g sulfato/L de H_2S .

7. RECOMENDACIONES

En estudios futuros se espera que los microorganismos oxidadores de H_2S , aislados de aguas residuales de metalmecánica, de minería, de termale y de otras fuentes, se pueda emplear en la producción de biogás de alta pureza, a través de un biorreactor a mediana o gran escala.

De igual forma se pueden continuar realizando estudios con diferentes muestras de aguas residuales, donde se considere que hay presencia de H_2S , con el fin de determinar en cual muestra de agua están los microorganismos que presenta mayor capacidad de oxidación.

Por otra parte, se podrían emplear otros medios de cultivo como estrategia de aislamiento y diferentes matrices de inmovilización, con la finalidad de observar el comportamiento de los microorganismos y la capacidad de oxidación de estos.

De acuerdo a las investigaciones, se evidencio que el H_2S , causa grandes problemas de corrosión de estructuras en el hormigón y el acero, motivo por el cual sería de gran ayuda realizar investigaciones utilizando estos microorganismos, con el fin de contribuir a la solución de estos problemas en el área industrial.

8. BIBLIOGRAFIA

Aguilar, N. 2011. Efecto del almacenamiento de bagazo de caña en las propiedades físicas de celulosa grado papel

Alcaldía Mayor de Bogotá. 2015. Banco Distrital de Programas y Proyectos Ficha de Estadística Básica de Inversión Distrital EBI-D

Arthur, R. Baidoo, M & Antwi, E. 2011. Biogas as a potential renewable energy source: A Ghanaian case study

Arthur, R & Hinkle, M. 1947. Preliminary Report. The Role of Microorganisms in Acid Mine Drainage

Avendaño, E. 2015. Panorama actual de la situación mundial, nacional y distrital de los residuos sólidos. Análisis del caso Bogotá D.C. Programa basura cero.

Bjornsdottir, S. Petursdottir, S. Hreggvidsson, O. Hjorleifsdottir, S. Arnfinnsson, J & Kristjansson, J. 2009. *Thermus islandicus* sp. nov., a mixotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from the Torfajokull geothermal área

Bohórquez, J. Cárdenas, E & Vides A. 2015. Programa de educación y sensibilización ambiental como estrategia para mejorar las condiciones de vida en el barrio lo amador ubicado en la ciudad de Cartagena de indias D. T. Y C.

Bolívar, F. 2004. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna.

Burgess JE, Parsons SA, Stuetz RM. Developments in odour control and waste gastreatment biotechnology: a review. *Biotechnol Adv* 2001;19:35–63.

Camacho, C. 2006. Biogás, rellenos sanitarios. Bogotá: UPME

CorpoEma (2010). Volumen 1: Plan de desarrollo para las fuentes no convencionales de energía en Colombia.

Caldwell, S. Liu, Y, Ferrera, I. Berevidge, T &Reysenbach. 2010. Thermocrinis minervae sp. nov., a hydrogen- and sulfur-oxidizing, thermophilic member of the Aquificales from a Costa Rican terrestrial hot spring.

Díaz, M. 2010. Eliminación del sulfuro de hidrógeno en el biogás, consideraciones tecnológicas que faciliten la obtención de biogás, para su aplicación en la agricultura y la industria, además de la cocción de alimento.

Decreto 1713. 2002. Por el cual se reglamenta la Ley 142 de 1994, la Ley 632 de 2000 y la Ley 689 de 2001, en relación con la prestación del servicio público de aseo, y el Decreto Ley 2811 de 1974 y la Ley 99 de 1993 en relación con la Gestión Integral de Residuos Sólidos.

EcuRed. 2017. Artículo carbón activado.

Espinosa, J. 2010 rutas metabólicas de oxidación del azufre en bacterias quimiolitioautótrofas, relevancia ambiental y biotecnología

Esteve, J. 2012. Reciclaje verde. Recuperado del 25 de agosto de 2016 de, <http://reciclajeverde.wordpress.com>.

FAO. 2012. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. El biogás, atractiva fuente de energía renovable para el desarrollo de los pequeños productores agropecuarios en América Latina y el Caribe.

Flores, G. Liu, Y. Ferrera, I. Beveridge T & Reysenbach, A. 2008. *Sulfurihydrogenibium kristjanssonii* sp. nov., a hydrogen- and sulfur-oxidizing thermophile isolated from a terrestrial Icelandic hot spring.

Fouquet, R. 2009. A brief history of energy, international handbook of the economics of energy, Cheltenham, UK and Northampton, MA USA: Edward Elgar Publishing, p. 1-19

Friedrich, C. Rother, D. Bardischewsky, F. Ouentmeier, A & Fischer, J. 2001. Oxidation of Reduced Inorganic Sulfur Compounds by Bacteria: Emergence of a Common Mechanism. *Applied and Environmental Microbiology* 67(7):2873-2882.

Gayh U, Stross A, Behrendt J, Otterpohl R. Desulphurization of biogas—analysis, evaluation and optimization. Third international symposium on energy from biomass and water. Venice, Italy; 2010.

Guo, X. You, X. Liu, L. Zhang, J. Liu, S and Jiang, C. 2009. *Alicyclobacillus aeris* sp. nov., a novel ferrous- and sulfur-oxidizing bacterium isolated from a copper mine

Hentz, L. Murray C, Thompson J, Gasner L & Dunson JB. 1990. Odor control research at the Montgomery county regional compost facility. The Water Pollution Control Specialty Conference Series - The Status of Municipal Sludge Management for the 1990

Hirayama, H, Takai, K. Inagaki, F. Nealson K. & Horikoshi, K. 2005. *Thiobacter subterraneus* gen. nov., sp. nov., anobligately chemolithoautotrophic, thermophilic,sulfur-oxidizing bacterium from a subsurface hot aquifer

IDEAM. 2007. Sulfatos en agua por el método nefelométrico

Ito, T. Sugita, K. Yumoto, I. Nodasaka, & and Okabe, S. 2005. *Thiovirga sulfuroxydans* gen. nov., sp. nov., a chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from a microaerobic waste-water biofilm

Jensen AB, Webb C. 1995a. Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*: A review. *Process Biochemistry* 30(3):225.

Janssen, A. Meijer, S. Bontsema, J & Lettinga, G. Application of there dox potential forcontrolling a sulfide oxidizing bioreactor. *Biotechnol Bioeng*1998;60:147–55.

Jaramillo, G & Zapata, I. 2008. aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos en Colombia. Universidad de Antioquia.

Jiménez, O. Cantú, v & Conde, A. 2006. Líneas de transmisión y distribución de energía eléctrico.

Kodama, Y & Watanabe, K. 2004. *Sulfuricurvumkujiense* gen. nov., sp. nov., a facultativelyanaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizingbacteriumisolatedfromanundergroundcrude-oilstoragecavity

Kohl, A & Nielsen, R. 1997. *Gas Purificaton*: Elsevier. 1 p.

Ley 1715, 2014. Por medio se regula la integración de las energías renovables no convencionales al sistema energético internacional.

López. F, Quinto.P, Aguilar. H & Garibay, C. 2015. Evaluación de la producción de biogás a partir de residuos orgánicos putrescibles en la ciudad de México.

Liu, X. Wang, B. Jiang, C & Liu, S. 2006. *Paracoccus sulfuroxidans* sp. nov., a sulfuroxidizer from activated sludge

Llaneza, H & Moris, M. (2010). Estudio de viabilidad de sistemas depurificación y aprovechamiento de biogas. Madrid - España: PSE Probiogas.

Ma, Y. Yang, B. & Zhao, J. (2006). Removal of H₂S by *Thiobacillus denitrificans* immobilized on different matrices. *Bioresource Technology*, 97(16), 2041–6. doi: 10.1016/j.biortech.2005.09.023.

Mori, K & Suzuki. K. 2008. *Thiofaba tepidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium of the Gammaproteobacteria isolated from a hot spring

Muirhead, T. La, P & Dennis, D. 1993. Air handling and scrubber retrofits optimize odor control. *Biocycle* 3:68.

Nogues, F. García, D y Rezeau. 2010. Energía de la biomasa (volumen 1), pág. 20.

Okabe S, Odagiri M, Ito T, Satoh H. Succession of sulfur-oxidizing bacteria in the microbial community on corroding concrete in sewer systems. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:971–80.

Pantoja, J. Takano, L. Zamariolli, M. Foresti, E & Silva, E. 2010. Performance evaluation of packing materials in the removal of hydrogen sulphide in gas-phase biofilters: Polyurethane foam, sugarcane bagasse, and coconut fibre.

Penagos, J & Aguas D. 2011. Reducción de los Residuos Sólidos Orgánicos en Colombia por medio del Compostaje Líquido

Peter, R. Disque, L & Peter, B. 2005. Adoption of photovoltaic power supply systems: A study of key determinants in India

Pinilla, M. 2015. Propuesta de educación ambiental que pueda contribuir al manejo adecuado de los residuos sólidos domiciliarios en el sector urbano del municipio de Raquira – Boyaca.

Pokorna, D & Zabranska, J. 2015. Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology

Ramírez, M. 2007. Viabilidad de un proceso para la eliminación conjunta de H_2S y NH_3 contenido en efluentes gaseosos. Universidad de Cádiz.

REN21. 2014. Renewables 2014 informe sobre la situación mundial.

REN21. 2011. Renewable 2011. Global status report.

Resolución 1045, 2003. "Por la cual se adopta la metodología para la elaboración de los Planes de Gestión Integral de Residuos Sólidos, PGIRS, y se toman otras determinaciones".

Rodríguez, S. 2011. Residuos sólidos en Colombia. Su manejo es un compromiso de todos. Artículo científico. Universidad Santo Tomás.

Rubiano, C. 2006. Aislamiento y caracterización de microorganismos termofilicos, anaeróbicos lipolíticos, proteolíticos y amilolíticos de manantiales termales de Paipa e Iza, (Boyacá).

Sorokin, D. Muntyan, M. Panteleeva, A. & Muyser, G. 2012. Thioalkalivibriosulfidiphilus sp. nov., a haloalkaliphilic, sulfur-oxidizing gammaproteobacterium from alkaline habitats

UNED. 2016. Energía y desarrollo sostenible.

UPME. 2009. Atlas de potencial energético de la biomasa residual en Colombia. Bogotá: Unidad de planeación minero energética.

UPME. 2014. Integración de las energías renovables no convencionales en Colombia.

US DOE. 2013. Wind Energy Cost, Performance and Pricing Trends: Past & Future. Ryan Wiser, Lawrence Berkeley National Laboratory. U.S. Department of Energy.

Van Durme GP, McNamara BF & McGinley CM (1992) Benchscale removal of odor and volatile organic compounds at a composting facility. Wat. Env. Res. 64: 19–27

Viviescas, M. 2014. Caracterización de Impactos Ambientales y Sociales generados por la construcción de grandes centrales hidroeléctricas en el país.

9. ANEXOS

9.1 Anexo 1. Curva patrón de sulfatos

A partir de la solución patrón de sulfatos de 1000 mg SO₄/L y de 100 mg SO₄/L, se toman las alícuotas que se señalan en la tabla, y se diluye al volumen correspondiente.

Tabla. Especificaciones de preparación de estándares de calibración y de control.

Estándar de calibración y/o control (mg SO ₄ /L)	Alícuota de estándar de 1000 m mg SO ₄ /L (mL)	Alícuota de estándar de 100 m mg SO ₄ /L (mL)	volumen de estándar preparado (mL)
3 curva		15	500
5 control		25	500
10 curva	5		500
20 curva	5		250
30 control	15		500
40 curva	10		250